

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Anežka Jirsová**

Molekulární mechanismy perzistence bakterií k antibiotikům  
Molecular mechanisms of bacterial persistence to antibiotics

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2021



**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Ireně Liché, CSc. za cenné rady, trpělivost a vstřícnost při vedení této bakalářské práce.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. 4. 2021

.....

Anežka Jirsová

## Abstrakt

Schopnost perzistovat je vlastní naprosté většině druhů bakterií. Perzisteři představují malou heterogenní frakci bakteriální populace, jež dokáže tolerovat působení antibiotik. Na rozdíl od rezistentních buněk, které se geneticky odlišují od zbytku populace citlivé na působení antibiotik, tvoří perzistentní buňky geneticky nerozlišitelnou subpopulaci. Perzisteři vznikají buď v důsledku působení stresu vyvolaného nepříznivými podmínkami okolního prostředí, nebo perzistentní subpopulace vzniká v důsledku stochastické indukce nezávislé na přítomnosti stresujících podmínek. Existují různé mechanismy, u nichž bylo prokázáno, že s jejich působením dochází u bakteriálních buněk k nastolení perzistentního stavu. Důležitou roli během vzniku perzistence hrají toxin-antitoxin systémy a jejich interakce s efekty stringentní odpovědi. Perzistentní stav je také ovlivňován změnami v protonmotivní síle (PMF) a kolísáním hladiny exprese energií generujících enzymů Krebsova cyklu (TCA). V této práci jsou charakterizovány perzistentní buňky a shrnuty dosavadní poznatky o molekulárních mechanismech vedoucích k navození perzistence u bakterií.

**Klíčová slova:** bakterie, perzistence, antibiotika, stringentní odpověď, PMF, TCA

## Abstract

The ability to persist is inherent in the vast majority of bacterial species. Persisters represent a small heterogeneous fraction of the bacterial population that can tolerate antibiotics. Unlike resistant cells, which are genetically distinct from the rest of the antibiotic-sensitive population, persister cells form a genetically indistinguishable subpopulation. Persisters arise either as a result of stress caused by adverse environmental conditions, or persister subpopulation arise as a result of stochastic induction independent of the presence of stressful conditions. There are various mechanisms by which bacterial cells have been shown to induce a persistent state. Toxin-antitoxin systems and their interaction with stringent response effectors play an important role during the development of persistence. The persistent state is also affected by changes in proton-motive force (PMF) and the fluctuations in the gene expression level of energy generating enzymes of the Krebs cycle (TCA). In this thesis, persister cells are characterized and the current knowledge about the molecular mechanisms leading to the induction of persistence in bacteria is summarized.

**Key words:** bacteria, persistence, antibiotics, stringent response, PMF, TCA

## Seznam zkratek

ACP	protein přenášející acyly
ACT	doména nacházející se na C-terminální doméně dlouhého RSH enzymu
aSD	anti-Shine-Dalgarno sekvence
asRNA	antisense RNA
ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EF-G	elongační faktor G
EF-Tu	elongační faktor tepelně nestabilní
FUM	fumaráza
GDP	guanosindifosfát
GLDH	glutamátdehydrogenáza
GltX	glutamyl-tRNA syntetáza
GTP	guanosintrifosfát
HGT	horizontální genový přenos
IF-2	iniciační faktor 2
mRNA	mediátorová RNA
ODH	oxoglutarátdehydrogenáza
ORF	otevřený čtecí rámec
PMF	protonmotivní síla
pppGpp	guanosinpentafosfát
PSM	moduliny rozpustné ve fenolu
QS	quorum sensing
RNA	ribonukleová kyselina
tmRNA	transferová-mediátorová RNA
RNAP	RNA polymeráza
RSH	homolog RelA/SpoT
SAH	malá hydroláza alarmonů
SAS	malá syntetáza alarmonů
SCS	sukcinyl-CoA syntetáza
SD	Shine-Dalgarno sekvence
sRNA	malá RNA
TA	toxin-antitoxin
TCA	trikarboxylová kyselina
TGS	doména nacházející se na C-terminální doméně dlouhého RSH enzymu

## Obsah

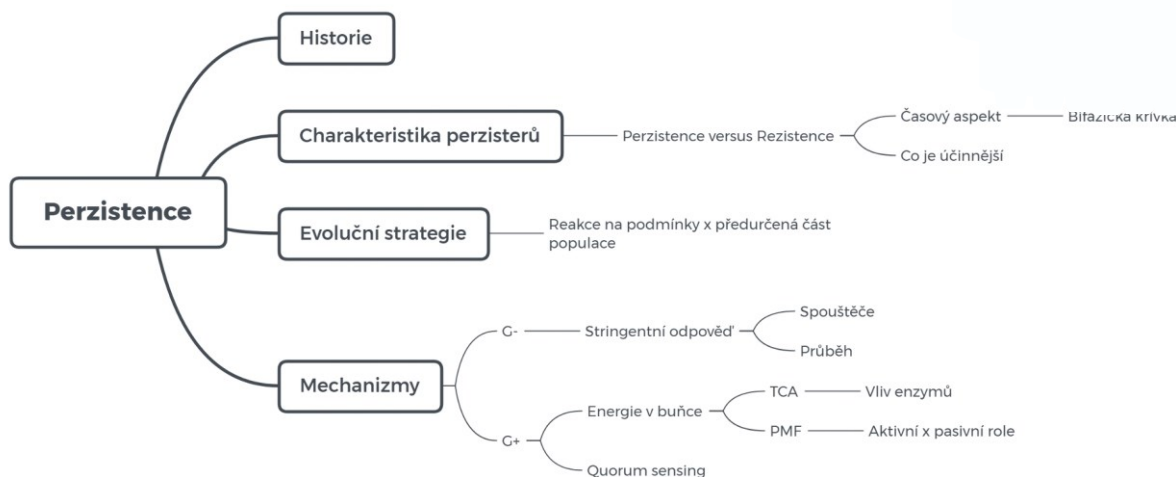
<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Historie .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Charakteristika perzisterů.....</b>	<b>3</b>
<b>4. Evoluční strategie .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Mechanizmy vzniku perzistence .....</b>	<b>7</b>
<b>5.1 Mechanizmy využívané grampozitivními i gramnegativními bakteriemi .....</b>	<b>7</b>
<b>5.1.1 Role Krebsova cyklu ve vzniku perzisterů .....</b>	<b>7</b>
<b>5.1.2 Vliv protonmotivní síly na vznik perzistentního stavu .....</b>	<b>8</b>
<b>5.1.3 Vliv quorum sensing na vznik perzistentního stavu.....</b>	<b>10</b>
<b>5.2 Mechanizmy využívané gramnegativními bakteriemi .....</b>	<b>12</b>
<b>5.2.1 Toxin-antitoxin systémy .....</b>	<b>12</b>
<b>5.2.1.1 HipBA toxin-antitoxin systém .....</b>	<b>15</b>
<b>5.2.1.2 RelBE toxin-antitoxin systém.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2.1.3 MazEF toxin-antitoxin systém .....</b>	<b>18</b>
<b>5.2.2 Stringentní odpověď.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Seznam literatury .....</b>	<b>25</b>

# 1. Úvod

Perzistence je fenomén, který byl popsán ve 20. století Josephem Biggerem v návaznosti na rozšíření používání antibiotik (Bigger, 1944). Od té doby se perzistence postupně dostala do popředí vědeckého zkoumání, neboť spolu s rezistencí snižuje účinnost léčby pomocí antibiotik a má podíl na vzniku chronických onemocnění. Jedná se o schopnost malé frakce bakteriální populace přechodně přežít působení antibiotik. Pravděpodobně jde o jednu z evolučních strategií, která se vyvinula, aby bylo zajištěno, že bakteriální kultura jako celek nebude z daného prostředí vymýcena. A to díky malému množství přeživších jedinců, kteří jsou schopni se opět rozmnožit po skončení nepříznivých podmínek zapříčiněných přítomností antibiotik v okolí (Vogwill *et al.*, 2016).

Cílem práce je shrnout současné poznatky o molekulárních mechanismech vzniku perzistence u grampozitivních a gramnegativních bakterií.

V této práci budou nejprve perzistující buňky charakterizovány a následně budou popisovány různorodé mechanismy jejich vzniku. Důraz bude kladen zejména na vznik perzisterů spojený s energetickým metabolismem a rozdílné mechanismy používané gramnegativními a grampozitivními bakteriemi. Strukturu práce názorně ukazuje následující schéma.



Obrázek 1 – Schéma práce



## 2. Historie

Perzistence byla objevena krátce po objevení antibiotik a začátku jejich používání v klinické praxi. Joseph Bigger dal buňkám, které přežily působení penicilinu, název perzisteři. Ve své práci z roku 1944 popisuje, že 0,01% frakce bakteriální populace *Staphylococcus pyogenes* měla schopnost tolerovat penicilin, a ten tedy tuto část buněk neusmrtil (Bigger, 1944).

V dalších letech se v souvislosti s antibiotiky zkoumala především rezistence. I díky tomuto zkoumání dnes dobře známe mechanismy, podle kterých rezistence funguje. Na perzistenci se však částečně i z důvodu výzkumu rezistence zapomnělo a opět se do hledáčku vědců dostala až v 80. letech 20. století, kdy se jí začal zabývat Harris Moyed. Ten studoval bakterii *Escherichia coli* K-12, kterou vystavil působení ampicilinu, a izoloval mutanty, u kterých pozoroval zvýšenou schopnost vytvářet perzistery. Zjistil, že tito mutanti nesou mutantní alelu *hipA7* a množství perzisterů po působení antibiotik narostlo přibližně o 3 řády (Moyed & Bertrand, 1983).

Nathalie Balaban v roce 2004 opět studovala perzistenci na bakterii *Escherichia coli*. Její experimenty ukázaly, že část populace, kterou tvořili perzisteři, měla nižší růstovou rychlost ve srovnání se zbytkem populace, a to ještě předtím, než na celou populaci začala působit antibiotiky. Na základě těchto výsledků vyvodila, že perzistence je spjata s různou rychlostí růstu jednotlivých buněk v bakteriální populaci. Jedná se tedy podle ní o fenotypový projev části populace bakterií (Balaban *et al.*, 2004).

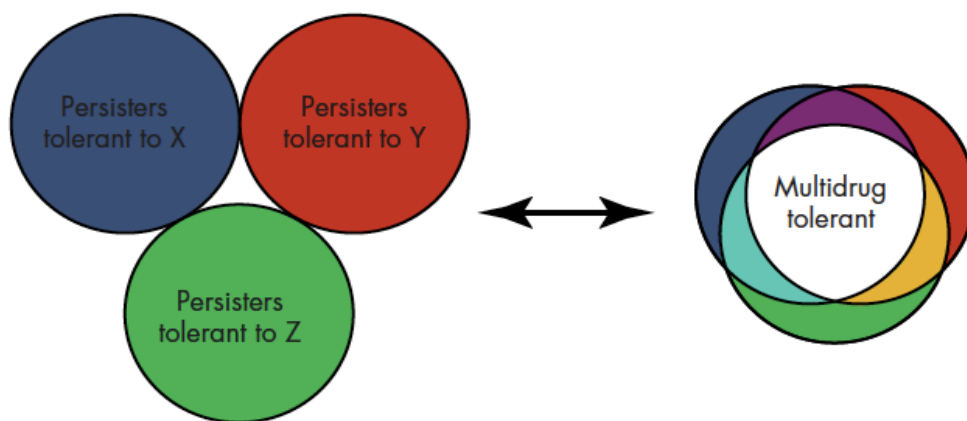
Dalším významným objevem bylo zjištění, že perzistentní buňky nikdy nevznikají v rané exponenciální fázi růstu. Naopak k jejich prudkému nárůstu dochází během střední exponenciální fáze. Toto bylo dokázáno díky pokusům Iris Keren (Keren *et al.*, 2004).

Perzisteři byli dlouhou dobu definováni jako buňky v dormantním stavu, kdy u nich nedochází k tvorbě buněčné stěny, je inhibována translace a aktivita topoizomerázy. Tyto předpoklady byly dostačující pro vysvětlení schopnosti buněk tolerovat působení antibiotik. Pokud buňky rostou pomalu, jsou chráněny před účinky baktericidních látek (Keren, Shah, *et al.*, 2004).

V současnosti je zřejmé, že perzistence je daleko složitější a nelze ji vysvětlit pouze pomocí dormantního stavu buňky (Orman & Brynildsen, 2013).

### 3. Charakteristika perzisterů

Dle současného názoru jako perzistery označujeme malou část bakteriální populace, která má na rozdíl od jejího zbytku schopnost přechodně tolerovat působení antibiotik. Perzisteři se od v populaci se nacházejících buněk citlivých na antibiotika nijak geneticky neliší. Jedná se pouze o fenotypové varianty bakterií, které utlumí svůj metabolismus tak, aby byly schopné přežít nepříznivé podmínky. Podle mnohých autorů se perzisteři od normálních buněk odlišují právě minimalizací metabolických reakcí, zastavením nebo výrazným zpomalením buněčného dělení, což ve svém důsledku vyústí v přechod do stavu dormance (Balaban *et al.*, 2004; Kwan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Bakterie v tomto stavu jsou schopné tolerovat přítomnost antibiotik ve svém okolí, neboť většina antibiotik působí na rostoucí buňky (Shan *et al.*, 2017; Zalis *et al.*, 2019). V další práci se hovoří o perzisterech jako o jakési pojistce bakteriální populace, která zajistí její přežití v případě náhlé změny podmínek prostředí. Ve stejné práci Kussell též uvádí, že perzistentní buňky se vyvíjejí z buněk citlivých vůči antibiotikům a mohou se v ně opět proměnit. V ten okamžik už není možné přeměněné perzistery od zbytku populace, která je vůči antibiotikům citlivá, odlišit. Frekvence, se kterou dochází k přeměně mezi buňkami citlivými vůči antibiotikům a buňkami perzistentními, je ovlivněna především tím, jak stabilní dané prostředí je a jak často v něm ke změnám dochází (Kussell *et al.*, 2005). Perzisteři nejsou tvořeni homogenní subpopulací bakteriálních buněk. Právě naopak se jedná o heterogenní skupinu, jejíž členové se od sebe liší svou fyziologií, vykazují rozdílnou míru tolerance antibiotik a odlišují se také v tom, kolik typů antibiotik jsou schopni tolerovat (Amato & Brynildsen, 2015). Tento rozdíl názorně ilustruje Obrázek 2. Vyplývá z něj též, že bude složitější eradikovat perzistery, kteří jsou tolerantní k více třídám antibiotik než ty, kteří jsou schopni přežít pouze působení antibiotika s konkrétním mechanismem účinku. Tito perzisteři totiž nepřežijí, jsou-li postupně vystaveni působení antibiotika s rozdílným mechanismem působení (Feng *et al.*, 2015). Multitolerantní perzistery takto není možné eliminovat (Hofsteenge *et al.*, 2013). Na levé části Obrázku 2 jsou znázorněny tři skupiny perzisterů. Každá z těchto skupin dokáže tolerovat právě jednu konkrétní třídu antibiotik označenou písmeny X, Y, Z. U těchto skupin perzistentních buněk platí, že jsou ke všem ostatním třídám antibiotik citlivé. Proto je možné zvolením vhodné kombinace několika antibiotik tyto perzistery eliminovat.



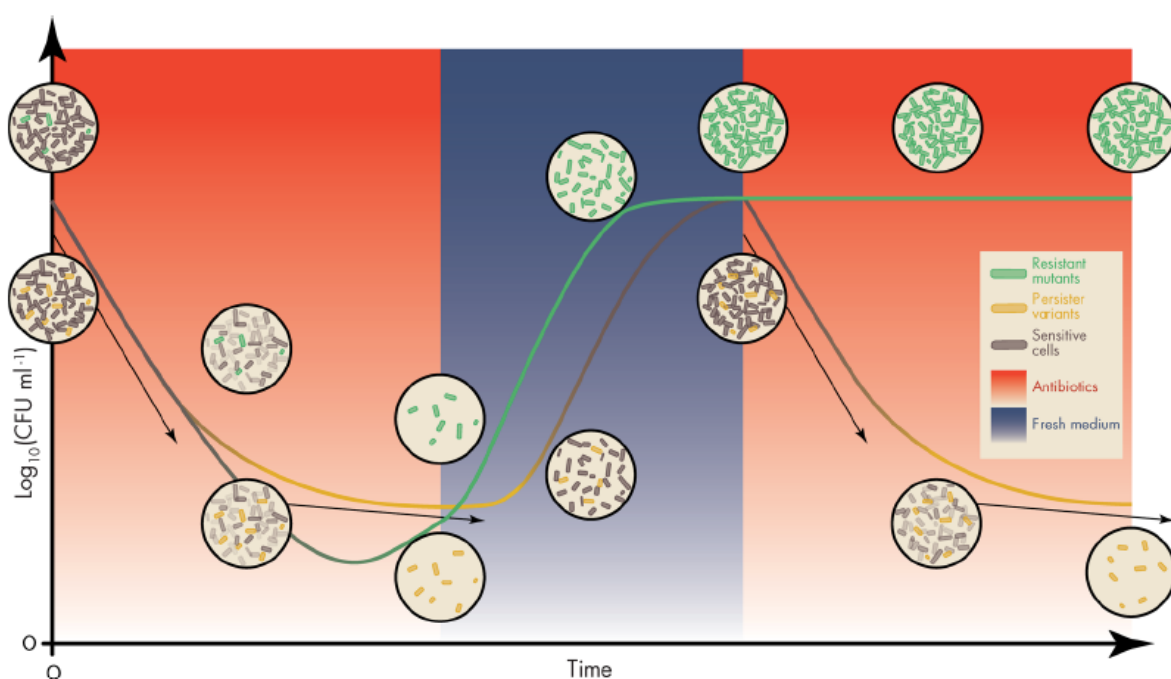
Obrázek 2 – Rozdíl mezi perzistery tolerantními ke specifickým druhům antibiotik a perzistery tolerujícími několik různých druhů antibiotik. Perzistery v levé části schématu je možné postupným působením antibiotik typu X, Y a Z eliminovat. Na perzistery spadající do skupiny znázorněné v pravé části nebude mít stejný postup prakticky žádný vliv. Převzato z Van den Bergh *et al.*, 2017.

Jak velkou část bakteriální populace perzisteři představují, je další otázka, ve které najdeme rozdíly. Tento aspekt je totiž ovlivněn tím, o jaký druh bakterií se jedná. V případě *Escherichia coli* je v literatuře popsáno, že v kultuře, která se nachází v exponenciální fázi se objevuje asi  $10^{-7}$ –  $10^{-5}$  perzisterů k celkovému počtu bakterií (Moyed & Bertrand, 1983; Moyed & Broderick, 1986; Korch & Hill, 2006). U *hipA7* mutantů se toto číslo může pohybovat v rozmezí  $10^{-3}$  –  $10^{-2}$  k celkovému počtu bakterií, což činí až 1 % všech buněk (Korch & Hill, 2006). Podíváme-li se na *Pseudomonas aeruginosa* zjistíme, že se podíl perzisterů v populaci pohybuje v rozmezí 0,001 - 0,1 %. Tento rozsah je dán tím, zda bakterie žijí volně nebo jsou součástí biofilmu, kde vždy dochází k nárůstu perzistentních buněk (Keren, Kaldalu, *et al.*, 2004; Spoering & Lewis, 2001)

K toleranci vůči působení antibiotik může kromě nastolení perzistentního stavu vést také rezistence. Na perzistenci a rezistenci je možné nahlížet jako na dvě různé cesty vedoucí ke společnému cíli, kterým je přežití působení antibiotik. Je však důležité od sebe tyto dva jevy odlišovat. Jak již bylo zmíněno dříve, perzistenci vykazují jednotlivé buňky bakteriální populace, které se od neperzistujících buněk geneticky nijak neliší. Na druhou stranu u buněk rezistentních změna genotypu nastala. Existuje několik mechanismů, jakými ke změně mohlo dojít. Jedním z nich je horizontální genový přenos (HGT), dále se může jednat o postupné hromadění krátkých mutací, jehož výsledkem je právě získání rezistence vůči danému typu antibiotik (Mwangi *et al.*, 2007).

Porovnání chování perzistentních a rezistentních bakterií během jejich vystavení antibiotikům poskytuje Obrázek 3. Je patrné, že rezistence je přenositelná z generace na generaci, což o perzistenci neplatí. Perzistenci lze charakterizovat tzv. křivkou hynutí, která charakterizuje

průběh přežívání buněk po působení antibiotik. V první fázi dojde k radikálnímu poklesu počtu buněk bakteriální populace, což je způsobeno usmrcením té části populace, která je tvořena buňkami citlivými k antibiotikům. Tato část výrazně převažuje nad počtem buněk, které jsou schopny antibiotika tolerovat. Ve druhé fázi dojde k velkému zpomalení snižování počtu buněk a zároveň platí, že velikost bakteriální populace zůstává stejná, neboť přeživší perzistentní buňky mají schopnost tolerance antibiotik, ale nemohou se v jejich přítomnosti množit. Jakmile jsou antibiotika z prostředí odstraněna, perzisteři se opět začnou dělit. Jejich dělením vzniká bakteriální populace citlivá k antibiotikům, v níž je podobné množství perzistentních buněk jako v populaci původní (Keren *et al.*, 2011).



Obrázek 3 – Chování bakteriálních populací obsahujících perzistentní (žluté) a rezistentní (zelené) buňky. Po vystavení bakteriálních populací působení antibiotik nejprve dochází k usmrcení bakterií, které jsou na antibiotika citlivé. V jedné populaci přežijí pouze perzisteři, kteří po skončení působení antibiotik jsou schopni se opět dělit a dají vzniknout populaci, jejíž naprostá většina bude opět náchylná na působení antibiotik. Ve druhé populaci zbydou pouze buňky rezistentní, které se, na rozdíl od perzisterů, mohou dělit již během působení antibiotik a vyvine se z nich populace skládající se výhradně z rezistentních buněk. Převzato z Van den Bergh *et al.*, 2017.

## 4. Evoluční strategie

Pokud se prostředí, v němž organismy žijí, mění v pravidelných intervalech, organismy se těmto změnám přizpůsobí. V případě, že se ve změnách prostředí nedá najít žádný vzorec a dochází k nim nepravidelně, je adaptace pro organismy problematická. I přes to si bakterie byly schopny vyvinout strategii, díky které jsou schopné se na měnící se podmínky adaptovat. Tato evoluční strategie se nazývá bet-hedging (Kussell & Leibler, 2005). Tvorba perzistentních buněk je jedna z evolučních strategií, pomocí kterých se dá zajistit, že bakteriální populace na daném místě přežije i přes to, že dojde k náhlým změnám v prostředí. Perzisteři vlastně vykazují altruistické chování, neboť obětují svou možnost množit se a v dormantním stavu čekají na chvíli, kdy bude potřeba jejich pomoc při záchraně celé bakteriální populace, která se náhle musí vyrovnat se suboptimálními podmínkami okolí (Kussell *et al.*, 2005).

Bet-hedging spočívá v přeměně části bakteriální populace z wild-type na odlišné fenotypové varianty. Cílem této strategie je tvorba subpopulací, které jsou adaptovány na případné změny prostředí, v němž se daná bakteriální populace nachází. Změna fenotypu, která přinese výhodu v případě, že dojde k obměně podmínek prostředí, však může znevýhodnit dané subpopulace ve stávajícím prostředí (Seger & Brockmann, 1987).

Perzistentní buňky se v bakteriální populaci z pohledu evoluce vyvinuly buď na základě náhodné indukce v rámci bet-hedging strategie, nebo vznikají díky schopnosti reagovat na signály z okolního prostředí, která vede k indukci adaptačních mechanismů. Způsob tvoření perzisterů v reakci na vnější podněty se nazývá responzivní diverzifikace (Kotte *et al.*, 2014). Vznik perzisterů pomocí responzivní diverzifikace je vidět například u vysokého nárůstu perzistentních buněk v populaci, která byla nejprve vystavena nízké a následně vysoké dávce fluorochinolonového antibiotika (Dörr *et al.*, 2010).

## 5. Mechanizmy vzniku perzistence

Všechny perzistentní buňky nemají stejnou fyziologii. S tím souvisí, že mechanismy vstupu do perzistentního stavu jsou také různorodé a liší se nejen mezi jednotlivými druhy bakterií, ale mohou být odlišné i v rámci jednoho bakteriálního druhu. V této kapitole je shrnutí doposud známých mechanismů nastolení perzistentního stavu.

### 5.1 Mechanizmy využívané grampozitivními i gramnegativními bakteriemi

#### 5.1.1 Role Krebsova cyklu ve vzniku perzisterů

Krebsův cyklus hraje zásadní roli v energetickém metabolismu bakterií, není tedy překvapivé, že se také uplatňuje během vzniku perzistujících buněk. V jednotlivých buňkách se hladina exprese energií generujících enzymů Krebsova cyklu může značně lišit, což je podle Elizy Zalis *et al.* (2019) jeden z faktorů, který ve svém důsledku vede ke vzniku perzistentního stavu u některých bakteriálních buněk. Mezi enzymy Krebsova cyklu, které se podílí na tvorbě energie patří glutamátdehydrogenáza (GLDH), oxoglutarátdehydrogenáza (ODH), sukcinyl-CoAsyntetáza (SCS) a fumaráza (FUM). Buňky, které pomocí těchto enzymů vyprodukují nižší množství energie, jsou poté přechodně schopné odolávat působení baktericidních látek (jakými jsou například antibiotika), které cílí na aktivní buňky. Za situace, kdy v pozdně exponenciálně rostoucí populaci bakterií je téměř vyčerpána glukóza, ale kyslíku je dostatek, může dojít k náhodnému kolísání hladin výše zmíněných enzymů Krebsova cyklu. Díky této fluktuaci hladin enzymů v jednotlivých buňkách se objeví nízkooenergetické buňky, které jsou schopny přechodně tolerovat přítomnost antibiotik ve svém okolí (Zalis *et al.*, 2019).

Také výsledky studie z roku 2018 ukazují vliv TCA cyklu na vznik perzistence u *Staphylococcus aureus*. Inaktivace TCA cyklu má za následek snížení množství redukčních ekvivalentů dodaných do elektronového transportního řetězce a snížení produkce protonmotivní síly (PMF), což u *Staphylococcus aureus* vede k perzistentnímu stavu. Mezi geny podílející se na nárůstu frekvence perzisterů v populaci patří například *sucA* a *sucB*, které kódují podjednotky ODH. Během exponenciální fáze růstu však enzymy TCA cyklu nastolení perzistence nijak neovlivňují, což je způsobeno tím, že během exponenciální fáze je TCA cyklus reprimován a jeho represe je ukončena ve stacionární fázi. TCA cyklus se tedy podílí na vzniku perzistentního stavu u *Staphylococcus aureus* pouze během stacionární fáze (Wang *et al.*, 2018). O perzistentních buňkách *Staphylococcus aureus*, které vzniknou v průběhu exponenciální fáze

růstu je známo, že obsahují nízkou hladinu ATP, které je dosaženo jinak než pomocí Krebsova cyklu (Conlon *et al.*, 2016).

### 5.1.2 Vliv protonmotivní síly na vznik perzistentního stavu

U některých antibiotik, konkrétně aminoglykosidů, je existence protonmotivní síly klíčová pro jejich úspěšné působení. Tato antibiotika ji využívají k tomu, aby pronikla dovnitř bakteriální buňky, kde se následně vážou na 30S podjednotku ribozomu, a způsobí tak inhibici proteosyntézy v bakteriální buňce (Hurwitz *et al.* 1981). Buňky, které PMF produkovat nebudou, ať už z důvodu poškozeného elektron-transportního řetězce nebo dormantního stavu, se stanou vůči aminoglykosidům tolerantní. Toto je pasivní role PMF při vzniku perzisterů.

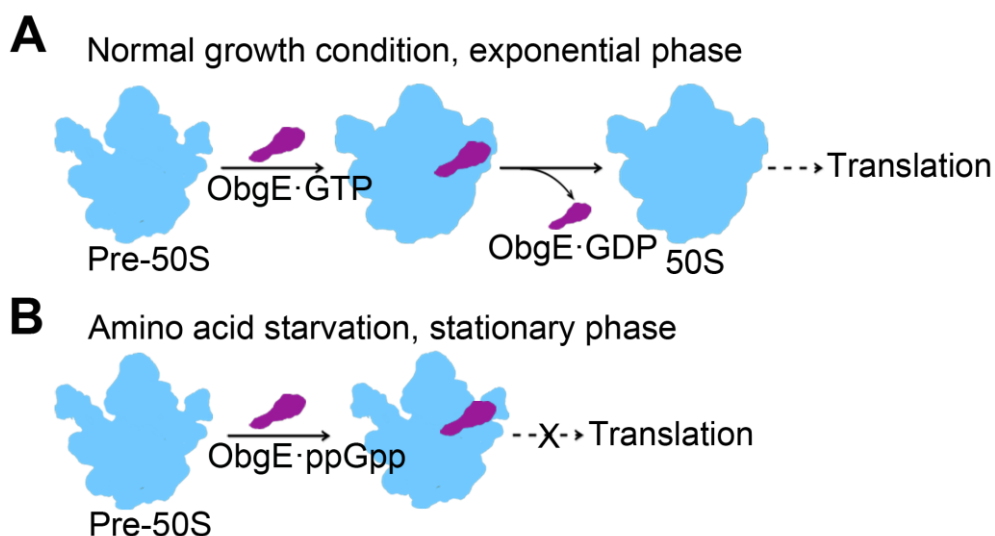
Jednou ze signálních drah vedoucích k nastolení perzistentního stavu způsobeného poklesem PMF je SOS odpověď. Ke spuštění SOS odpovědi dochází, pokud v buňce dojde k poškození DNA (Dörr *et al.*, 2009, 2010). Poškození DNA vede k aktivaci proteinu RecA díky jeho vazbě na jednovláknovou DNA. Represor SOS odpovědi, LexA, je štěpen aktivovaným RecA. Díky degradaci LexA může začít exprese genů SOS dráhy, které jsou reprimovány vazbou LexA na jejich promotory (Brent & Ptashne, 1981). Promotor genu pro toxin TisB je jedním z genů pod kontrolou represoru LexA. TisB je hydrofobní peptid o délce 29 aminokyselin, který asociuje s cytoplazmatickou membránou, vytváří v ní póry a snižuje PMF a ATP v buňce (Unoson & Wagner, 2008). Translace *tisB* mRNA je inhibována antitoxinem IstR-1. Po degradaci LexA je koncentrace *tisB* mRNA vyšší než koncentrace antitoxinu IstR-1 a toxin TisB je syntetizován (Berghoff *et al.*, 2017; Darfeuille *et al.*, 2007).

Pro vznik perzisterů zprostředkovaný toxinem TisB je rozhodující, že je po aktivaci transkripce genu *tisB* jeho mRNA translatována v dostatečném množství, aby mohlo dojít k vytvoření pórů v membráně vedoucí k depolarizaci membrány a snížení PMF. Perzisteři, kteří vzniknou v důsledku aktivace SOS odpovědi, jsou tolerantní vůči fluorochinolonovým antibiotikům (Dörr *et al.*, 2009).

Kromě toxinu TisB, exprimovaného v důsledku spuštění SOS odpovědi, se na nastolení perzistentního stavu díky poklesu PMF podílí i toxin HokB ve spolupráci s proteinem Obg. Výsledky studie z roku 2019 ukazují, že pro spuštění exprese genu *hokB*, který kóduje peptid, jež tvoří toxickou složku HokB/SokB TA systému, je nezbytná interakce mezi ppGpp nebo GDP a Obg (Verstraeten *et al.*, 2019). HokB následně způsobí depolarizaci membrány, která vede

k přechodu do perzistentního stavu, protože v bakteriální membráně vytváří póry, skrz něž unikají molekuly ATP (Wilmaerts *et al.*, 2018).

Natalie Verstraeten ve svém výzkumu potvrdila klíčovou roli GTPázy Obg ve vzniku perzistence u *Escherichia coli*, když se bakteriální populace nachází v podmínkách chudých na nutrienty. Obg podle Verstraeten ovlivňuje perzistenci i u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tímto výsledkem bylo ukázáno, že role Obg v perzistenci je konzervována (Verstraeten *et al.*, 2015). Obrázek 4 znázorňuje vliv Obg proteinu na 50S podjednotku ribozomu a následnou translaci v závislosti na tom, zda buňka má dostatek nutrientů pro růst nebo trpí nedostatkem aminokyselin. Obg protein je aktivován po navázání na ribozom, skládá se z několika domén, a to N-terminální domény zpravidla obsahující velké množství glycinů, G-domény a C-terminální domény, která v závislosti na tom, o jaký bakteriální druh se jedná, má různou délku a liší se též v sekvenci aminokyselin. Bylo také zjištěno, že C-terminální doména tohoto proteinu ovlivňuje vazbu GTP na Obg. C-terminální doména Obg ovlivňuje vazbu GTP na Obg, ale její vliv na vazbu GDP a (p)ppGpp je mizivý.



Obrázek 4 – Funkce translačního faktoru ObgE na ribozomální podjednotku 50S a následnou translaci v různých fázích růstu. Převzato z Feng *et al.*, 2014.

Z těchto zjištění vyplývá, že ve stavu, kdy je na Obg navázáno GTP, dojde u proteinu ke konformační změně, která má za následek přechodné navázání C-terminální domény na centrální G-doménu, právě na níž dochází ke stále se opakujícím přechodům ze stavu vázajícího GDP a GTP (Gkekas *et al.*, 2017). GTPáza Obg je schopna kromě GDP a GTP vázat i (p)ppGpp a ovlivňovat poměr ppGpp ku pppGpp v buňce během nedostatku aminokyselin (Persky *et al.*, 2009).



Natalie Verstraeten a kolektiv vytvořili pomocí metod genového inženýrství kmeny *Escherichia coli*, u nichž bylo možné regulovat množství exprimovaného proteinu Obg. Následně u kultur ve stacionární fázi, které Obg produkovaly v nadměrném množství, byla zkoumána hladina perzistentních buněk po vystavení těchto kultur působení ofloxacinu a tobromycinu. Ofloxacin je antibiotikum, které inhibuje gyrázu, tobromycin cílí na proteosyntézu. Ukázalo se, že u nich množství perzisterů několikanásobně narostlo. Zároveň byla potvrzena korelace mezi úrovní exprese Obg a počtem perzistujících buněk (Verstraeten *et al.*, 2015).

PMF ovlivňuje vznik tolerantních buněk také aktivně. Některé proteiny, jejichž funkcí je odvádět z buňky látky pro tuto buňku toxické, využívají jako zdroj energie PMF (Li *et al.*, 1995 podle Paulsen *et al.*, 1996). Pu ve své publikaci z roku 2016 ukázal, že efluxní pumpy, které využívají PMF jako energetický zdroj mají důležitou roli ve zvýšení tolerance antibiotik. Buňky vystavil působení beta-laktamového antibiotika. Buňky, u nichž stochasticky došlo ke zvýšení exprese genů spojených s efluxem škodlivých látek, měly vyšší pravděpodobnost, že působení antibiotika přežijí díky akumulaci nižšího množství antibiotik v buňce. Bakterie se působení beta-laktamových antibiotik brání vstupem do dormantního stavu. Než však k nastolení dormance, spojené i s redukcí PMF, dojde, pomáhají efluxní pumpy snižovat množství antibiotik nahromaděných uvnitř buňky a podporují tak vznik perzistentního stavu (Pu *et al.*, 2016).

### 5.1.3 Vliv quorum sensing na vznik perzistentního stavu

Kromě výše zmíněných mechanismů se na vzniku perzistentního stavu podílí také quorum sensing (QS). Jeho vliv na perzistenci byl prokázán jak u *Pseudomonas aeruginosa*, tak u *Streptococcus mutans* (Leung & Lévesque, 2012; Möker *et al.*, 2010). Nejlépe je však vliv QS na vznik perzistentního stavu prozkoumán u Agr systému u bakterie *Staphylococcus aureus*. Agr systém patří mezi klíčové regulátory virulence. Recentní studie však ukázala, že Agr systém negativně ovlivňuje nastolení perzistentního stavu. Agr systém kontroluje expresi virulenčních faktorů nazývaných PSM (moduliny rozpustné ve fenolu). PSM peptidy třídy  $\alpha$  poškozují buněčnou membránu perzistentních buněk, což vede ke snížení jejich tolerance antibiotik (Ebner *et al.*, 2017). Inaktivace těchto PSM kódovaných geny *psmA* a *psm $\beta$*  vyústila ve zvýšení počtu perzisterů tolerantních vůči působení fluorochinolonového antibiotiku levofloxacin. Ke stejnému výsledku vedla i mutace v genech *agrC* a *agrD* (Xu *et al.*, 2017).

[illegible]

## 5.2 Mechanizmy využívané gramnegativními bakteriemi

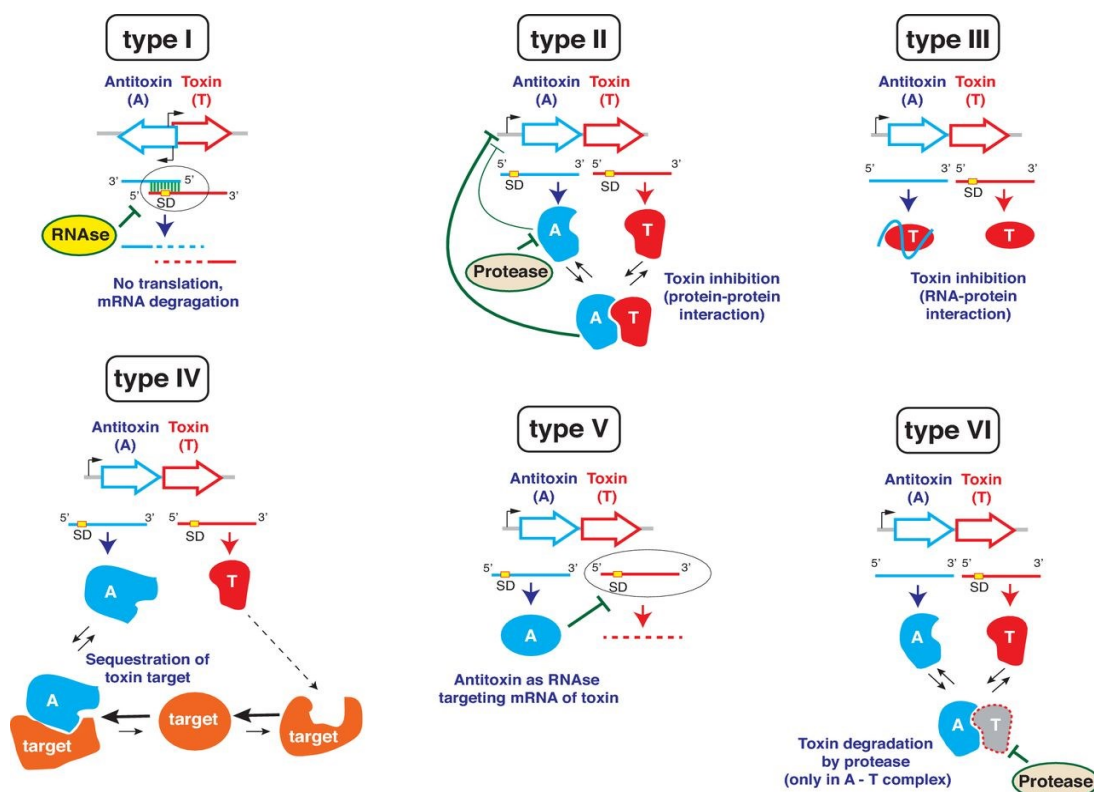
Gramnegativní bakterie kromě výše zmíněných mechanismů navození perzistence využívají ještě další způsoby, pomocí kterých se dostávají do stavu, v němž jsou schopné působení antibiotik a dalších stresových podmínek tolerovat. U gramnegativních bakterií hrají při vzniku perzistence zásadní roli tzv. toxin-antitoxin systémy a stringentní odpověď.

### 5.2.1 Toxin-antitoxin systémy

Toxin-antitoxin systémy jsou genetické elementy kódující 2 geny, a to geny pro toxin a antitoxin, jejichž produkty se liší svou funkcí a stabilitou. Toxiny tvoří stabilnější složku, zatímco antitoxiny jsou degradovány rychleji nebo za stresových podmínek. Toxin-antitoxin systémy je možné rozdělit do 6 skupin v závislosti na povaze toxinu a podle toho, jakým způsobem spolu toxin a antitoxin interagují.

Toxin-antitoxin systémy se též dají rozdělit podle toho, kde jsou kódovány. V tomto případě rozdělujeme TA moduly na systémy kódované na plazmidech nebo chromozomech (Leplae *et al.*, 2011). Funkce TA systémů vyskytujících se na plazmidech jsou dobře prozkoumány. Bylo prokázáno, že se podílejí na post-segregačním zabíjení, a to dnes známým molekulárním mechanismem (K. Gerdes *et al.*, 1986). Na druhou stranu o funkcích TA systémů kódovaných na chromozomech je toho známo méně. Pandey a Gerdes v roce 2005 zveřejnili studii, v níž se zabývali zkoumáním TA lokusů v genomech 16 zástupců domény *Archaea* a 110 zástupců domény *Bacteria*. Zjistili, že mikroorganismům, které obligátně žijí v úzkém vztahu s jinými organismy, a mají tak téměř neměnné životní prostředí ve svém okolí, vymizely z genomu lokusy pro TA systémy. Naopak u sledovaných volně žijících *Archaea* a *Bacteria* našli Pandey a Gerdes TA lokusy v nadbytku. V extrémních případech, jako například u *Mycobacterium tuberculosis*, bylo na základě analýzy osekvenovaného genomu objeveno až 38 různých TA lokusů. Takto vysoký počet TA lokusů u některých volně žijících pomalu rostoucích mikroorganismů podle autorů podporuje hypotézu, že TA systémy jsou součástí signálních drah, jež se spustí v reakci na stres. Jako prvky těchto signálních drah zvyšují TA systémy biologickou fitness jejich nositelům (Pandey & Gerdes, 2005). Bylo prokázáno, že některé TA systémy jsou důležité pro navození a udržení perzistentního stavu (Helaine *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Obrázek 6 schematicky znázorňuje rozdíly v jednotlivých typech TA systémů a interakce toxinů s antitoxiny uvnitř jednotlivých typů TA systémů.



Obrázek 6 – Typy toxin-antitoxin systémů a způsoby interakce toxinů s antitoxiny v rámci jednotlivých typů. Převzato z Lobato-Márquez *et al.*, 2016.

Antitoxiny TA systémů typu I jsou antisense RNA. Po vzniku toxinové mRNA dojde na základě komplementarity bází toxinové mRNA a antitoxinové asRNA k interakci mezi těmito dvěma vlákny a vzniku úseku dsRNA. Tento nově vzniklý dsRNA úsek je pro ribozomy těžko přístupný, což vede ke znemožnění iniciace translace a v konečném důsledku k tomu, že toxin není v buňce produkován (Brantl, 2012). Příkladem TA systému typu I je HokB/SokB TA modul. Pokud dojde k expresi toxinu HokB, následuje vytvoření pórů v membráně a narušení membránového potenciálu vedoucí ke snížení množství ATP v buňce (Wilmaerts *et al.*, 2018). Ze všech typů TA systémů jsou toxin-antitoxin systémy typu II nejlépe prostudovány. Oba komponenty tohoto modulu mají proteinovou povahu. I zde platí, že toxin je stabilnější než antitoxin, který je degradován buněčnými proteázami. Proteázy interagují s C-terminální doménou antitoxinů. Konformace této domény se liší podle toho, zda se antitoxin v buňce nalézá volně nebo ve stabilním komplexu s toxinem (Yamaguchi *et al.*, 2011 podle Brzozowska & Zielenkiewicz, 2013). Za podmínek, které umožňují normální buněčný růst, tvoří většina antitoxinů komplexy s toxiny. Pokud dojde ke změně, proteázy indukované stresem začnou uvolňovat antitoxiny z komplexů. Toxiny díky tomu přestanou být inhibovány a mohou na buňku začít působit (Kenn Gerdes *et al.*, 2005; Yamaguchi & Inouye, 2009 podle Yamaguchi *et*

*al.*, 2011). Operon TA systémů typu II je tvořen dvěma ORF, kde jako první za promotorem se nachází gen pro antitoxin, který je následován genem pro toxin. Regulace transkripce operonu je zprostředkována pomocí vazby buď pouze antitoxinu, nebo celého toxin-antitoxin komplexu na promotor (Kedzierska *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008 podle Bukowski *et al.*, 2011). U TA systémů typu II se na základě poměru množství toxinu a antitoxinu tvoří různé komplexy, které se liší svou afinitou k promotoru TA systému. Takováto tvorba odlišných TA komplexů a jejich rozdílná afinita k promotoru je popsána například u TA systému RelBE, kde funguje děj, jemuž se říká podmíněná kooperativita (Boggild *et al.*, 2012; Cataudella *et al.*, 2012; Overgaard *et al.*, 2008).

Antitoxin TA systémů typu III je sRNA. Účinek toxinu je u tohoto typu TA systému neutralizován pomocí přímé interakce antitoxinu, který je ve formě sRNA, s toxinem proteinové povahy. Toxin s antitoxinem spolu vytvoří komplex protein-RNA, díky čemuž je aktivita toxinu zablokována (Blower *et al.*, 2011, 2012).

U všech známých typů TA systémů spolu toxin a antitoxin interagují. Jedinou výjimkou je toxin-antitoxin modul typu IV, kde do kontaktu přicházejí pouze antitoxin a cíl toxinu. Díky tomu se následně toxin není schopen na svůj substrát navázat a je tak znemožněno jeho působení v buňce (Tan *et al.*, 2011). Konkrétním příkladem TA systému typu IV je TA modul YeeUV. Toxický účinek YeeV spočívá v jeho interakci cytoskeletárními proteiny FtsZ a MreB vedoucí k inhibici růstu způsobené zabráněním polymerizace jak FtsZ, tak MreB. Antitoxin YeeU neutralizuje toxicitu YeeV tím, že se sám naváže na FtsZ a MreB a zprostředkuje uspořádání polymerů těchto cytoskeletárních proteinů do svazků a chrání je tak před působením toxinu YeeV (Masuda *et al.*, 2012 a,b).

Příkladem TA systému typu V je GhoS/GhoT. GhoS je antitoxin, a to konkrétně endoribonukleáza, která štěpí GhoT mRNA, čímž zapříčiní, že mRNA tohoto toxinu není translatována, a nevzniká tedy žádný pro buňku toxický produkt této translace (Wang *et al.*, 2012).

Poslední dnes známý typ TA systémů je toxin-antitoxin systém typu VI. Jako příklad tohoto typu TA systému lze uvést SocAB vyskytující se u gramnegativní bakterie *Caulobacter crescentus*. Od předchozích TA systémů se odlišuje tím, že toxin SocB je nestabilní. K degradaci SocB dochází pomocí proteázy ClpXP. Antitoxin tohoto TA modulu plní funkci adaptorového proteinu zajišťujícího proběhnutí degradace toxinu. Toxin SocB je degradován proteázou pouze v případě, že vytvoří komplex s antitoxinem SocA. Toxický účinek SocB spočívá v inhibici

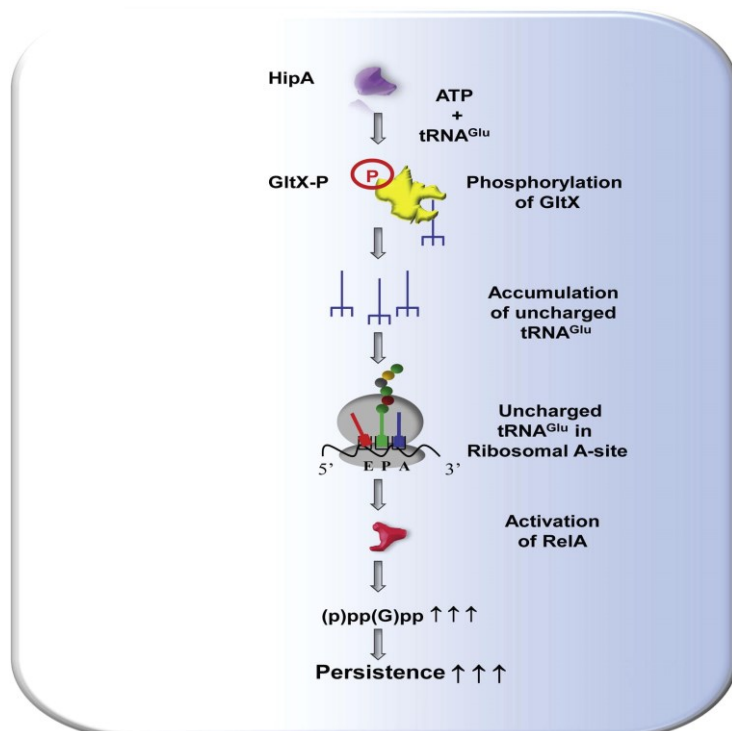
replikace v průběhu elongační fáze. Inhibice je způsobena vazbou SocB na svorkový protein, kódovaný genem *dnaN*, vedoucí k rozpadu replikační vidlice (Aakre *et al.*, 2013).

V následujících podkapitolách jsou podrobněji rozebrány konkrétní příklady TA systémů, u kterých byla souvislost s navozením perzistentního stavu prokázána. Všechny uvedené příklady patří mezi TA systémy typu II a jsou jimi HipBA toxin-antitoxin systém, RelBE toxin-antitoxin systém a MazEF toxin-antitoxin systém.

#### 5.2.1.1 HipBA toxin-antitoxin systém

Moyed a Bertrand v roce 1983 objevili u *Escherichia coli* alelu *hipA7*, která měla pozitivní vliv na frekvenci, s jakou u této bakterie docházelo k navození perzistentního stavu (Moyed & Bertrand, 1983). Genem *hipA* je kódována serin/threonin protein kináza patřící do fosfatidylinositol 3-/4- kinázové nadrodiny, což je protein skládající se ze 440 aminokyselin. HipA představuje v tomto TA systému toxin, který inhibuje buněčný růst (Black *et al.*, 1991; Correia *et al.*, 2006; Germain *et al.*, 2013). Na základě výsledků *in vitro* experimentů z roku 2009 se zdálo, že příčinou zastavení růstu buněk je fosforylace translačního faktoru EF-Tu serin/threonin protein kinázou HipA (Schumacher *et al.*, 2009). Nicméně pozdější experimenty odhalily, že HipA necílí na EF-Tu. Bylo zjištěno, že skutečným substrátem tohoto toxinu je glutamyl-tRNA syntetáza, na níž HipA fosforyluje Ser239, který se nachází v blízkosti aktivního centra tohoto enzymu. Glutamyl-tRNA syntetáza fosforylací ztratí svou aminoacylovou aktivitu, což primárně vede k nedostatku nabitých glutamyl-tRNA a to až ke stringentní odpovědi, jejíž průběh bude popsán níže (Germain *et al.*, 2013). Účinek HipA je neutralizován pomocí HipB, který je kódován v jeho těsné blízkosti proti směru transkripce (Korch & Hill, 2006). Produkt genu *hipB* je proteinový antitoxin menší velikosti než produkt genu *hipA*. Jedná se o transkripční represor o délce 88 aminokyselin. Spolu s regulační oblastí tvoří tyto dva geny *hipBA* operon. HipB hladinu transkripce obou genů snižuje tím, že se naváže na 4 místa v regulační oblasti operonu, mezi něž patří mimo jiné i -10 a -35 sekvence promotoru, díky čemuž HipB znemožní nasednutí RNA polymerázy. Jak již bylo zmíněno výše, antitoxiny jsou obecně méně stabilní než toxiny a jsou degradovány různými proteázami. HipB není z tohoto pohledu výjimkou. Experimenty Sonjy Hansen ukázaly, že antitoxin HipB je cílem Lon proteázy, která rozeznává a váže se na C-terminus tohoto proteinu v případě, kdy antitoxin není v komplexu s HipA a není navázán na regulační oblast *hipBA* operonu. Antitoxin HipB je schopen se na regulační oblast *hipBA* operonu navázat nezávisle na tom, zda se v buňce nachází volně nebo v komplexu s HipA. Toxin HipA s DNA interaguje pouze v případě, že s HipB

vytvořil komplex, v němž jsou dvě molekuly HipA navázány na dimer HipB (Black *et al.*, 1991, 1994; Hansen *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2009).



Obrázek 7 – Shrnutí mechanismu, kterým se HipBA TA systém podílí na vzniku perzistentního stavu. Toxin HipA po aktivaci fosforyluje GltX, čímž inhibuje její aminoacylovou aktivitu. Tato inhibice vede k nárůstu koncentrace nenabitých tRNA<sup>Glu</sup>, které se dostanou do A-místa ribozomu a aktivují RelA. Aktivace RelA způsobí nárůst koncentrace alarmonu (p)ppGpp vedoucí k nastolení perzistentního stavu. Převzato z Germain *et al.*, 2013.

#### 5.2.1.2 RelBE toxin-antitoxin systém

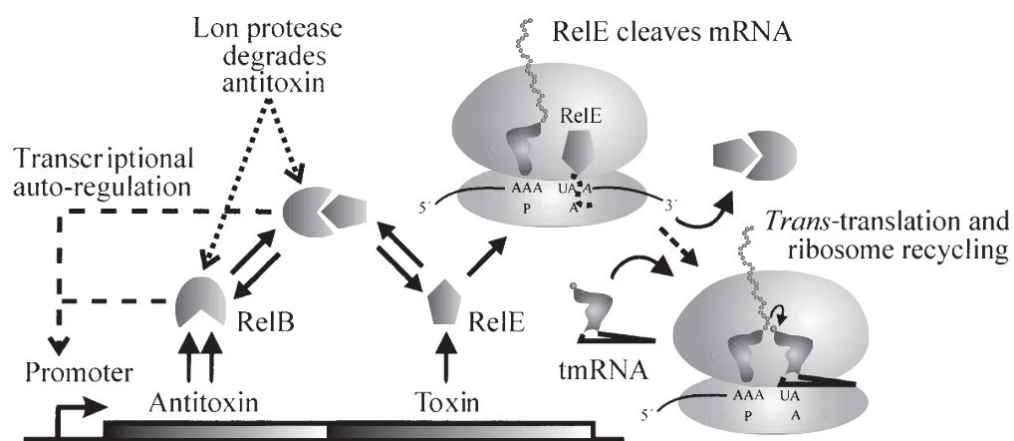
Dalším velmi studovaným toxin-antitoxin systémem, který se uplatňuje při nastolení perzistentního stavu je RelBE. Operon *relBE* je tvořen dvěma geny. Genem pro antitoxin RelB, který je po směru transkripce následován genem, jehož produktem je cytotoxický protein RelE o velikosti 10 kDa (Gotfredsen & Gerdes, 1998; Tashiro *et al.*, 2012). Toxin RelE patří mezi specifickou sekvenci štěpící, na ribozomu závislé mRNA endoribonukleázy (Pedersen *et al.*, 2003). Funguje jako inhibitor translace, což vede k inhibici růstu bakterií (Keren, Shah, *et al.*, 2004). Za situace, kdy netvoří komplex s antitoxinem RelB, štěpí mRNA, jež je právě pomocí ribozomů translatována. Transkripce operonu *relBE* je autoregulována pomocí antitoxinu RelB. RelB se váže na promotor operonu a RelE funguje jako korepresor. Hladina transkripce operonu je obvykle nízká, nicméně k jejímu zvýšení dojde, pokud se buňka dostane do stresových podmínek, jako je například nedostatek aminokyselin. Při nedostatku aminokyselin vzroste aktivita Lon proteázy, která degraduje RelB, což má za následek uvolnění toxinu, konec inhibice jejich aktivity a zastavení translačních procesů v buňce (S. K. Christensen *et al.*, 2001).

Podle výsledků *in vitro* experimentů bylo ukázáno, že RelE degraduje mRNA navázanou na aminoacylové místo ribozomu velmi specificky. RelE štěpí mRNA v místě stop kodonu mezi nukleotidy nacházejícími se na druhém a třetím místě. Výsledky této studie ukazují, že kodon UAG je toxinem RelE štěpen s nejvyšší afinitou, s nižší afinitou je štěpen kodon UAA a s nejnižší afinitou dochází ke štěpení stop kodonu UGA (Pedersen *et al.*, 2003). Pozdější výsledky tuto hypotézu vyvrátily. Výsledky *in vivo* experimentů Jennifer Hurley ukázaly, že endoribonukleázová aktivita cytotoxického RelE není sekvenčně závislá. Její studie publikovaná v roce 2011 ukazuje, že nejčastěji ke štěpení mRNA dochází ve vzdálenosti 70 – 100 kodonů od začátku translace, tedy na 5' konci mRNA (Hurley *et al.*, 2011).

U buněk, v nichž byla translace inhibována pomocí toxinu RelE, dochází k jejímu obnovení pomocí transferové-mediátorové RNA (tmRNA). Tato RNA plní během obnovení translace dvě role. Je schopna uvolnit ribozom z degradované mRNA. Její druhá role spočívá v označení polypeptidu, který vznikl translací části toxinem poškozené mRNA, k jeho degradaci pomocí proteáz (Susanne K. Christensen & Gerdes, 2003). tmRNA je schopna najít a rozeznat ribozom, na němž je navázána mRNA s chybějícím stop kodónem. Díky své doméně podobné tRNA<sup>Ala</sup> je schopna se na zastavený ribozom navázat a přidat na C-konec polypeptidu vznikajícího podle poškozené mRNA alanin, který tmRNA nese. Po zařazení alaninu na konec polypeptidu začne tmRNA plnit funkci mRNA. Obsahuje totiž sekvenci nukleotidů kódující peptid o délce 10 aminokyselin, který slouží jako značka k degradaci poškozeného polypeptidu. Po translaci značky ANDENYALAA dojde k terminaci translace, uvolnění polypeptidu z ribozomu a degradaci polypeptidu s navázanou ANDENYALAA značkou specifickými proteázami (Keiler *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 1995).

Obrázek 8 ukazuje organizaci a jednotlivé komponenty *relBE* operonu.





Obrázek 8 – Schéma působení RelBE TA systému. Schéma organizace relBE operonu. Promotor operonu je regulován pomocí antitoxinu RelB a RelBE komplexu. Po degradaci antitoxinu Lon proteázou je toxin RelE uvolněn a štěpí mRNA navázanou na ribozom mezi 2. a 3. místem kodónu navázaného v A-místě ribozomu. K uvolnění ribozomu z mRNA štěpené RelE toxinem dochází díky tmRNA poté, co je toxin RelE neutralizován antitoxinem RelB. Převzato z Pedersen et al., 2003.

### 5.2.1.3 MazEF toxin-antitoxin systém

MazEF toxin-antitoxin systém je jedním z nejvíce prozkoumaných na chromozomu kódovaných TA modulů (Vesper et al., 2011). Toxickou složku MazEF TA systému představuje 111 aminokyselin dlouhý protein kódovaný genem *mazF*. MazF je sekvenčně specifická endoribonukleáza mající vysokou specifitu pro jednovláknovou RNA. Zhang a kolektiv ve své studii z roku 2003 zjistili, že sekvence, která je MazF endoribonukleázou rozeznávána a štěpena, je trojice nukleotidů ACA (Zhang et al., 2003).

Gen *mazE* o délce 83 aminokyselin, který se nachází proti směru transkripce, kóduje antitoxin MazEF TA systému (Vesper et al., 2011). Produkt genu *mazE* je v porovnání s toxinem MazF méně stabilní a při stresových podmínkách je degradován ATP-dependentní serin proteázou ClpAP, čímž dojde k aktivaci toxinu. Toxická aktivita MazF se projeví také díky účinku proteázy Lon, která je aktivována nárůstem koncentrace molekuly (p)ppGpp v buňce (Aizenman et al., 1996). Nárůst koncentrace alarmonu (p)ppGpp v buňce způsobí zastavení transkripce *mazEF* operonu, což vede k zastavení neutralizace účinků MazF pomocí antitoxinu MazE, který je rychleji degradován (Engelberg-Kulka et al., 2005). Exprese *mazEF* operonu je autoregulována. Za příznivých podmínek, kdy buňka není nijak stresována, je transkripce operonu reprimována buď dimerem antitoxinu MazE, nebo komplexem tvořeným dvěma dimery toxinu MazF, mezi nimiž se nachází dimer MazE (Marianovsky et al., 2001). Stejně jako u RelBE TA systému, je pro hladinu transkripce *mazEF* operonu v dané buňce rozhodující poměr koncentrací jednotlivých složek tohoto operonu v konkrétní buňce. Hladina transkripce

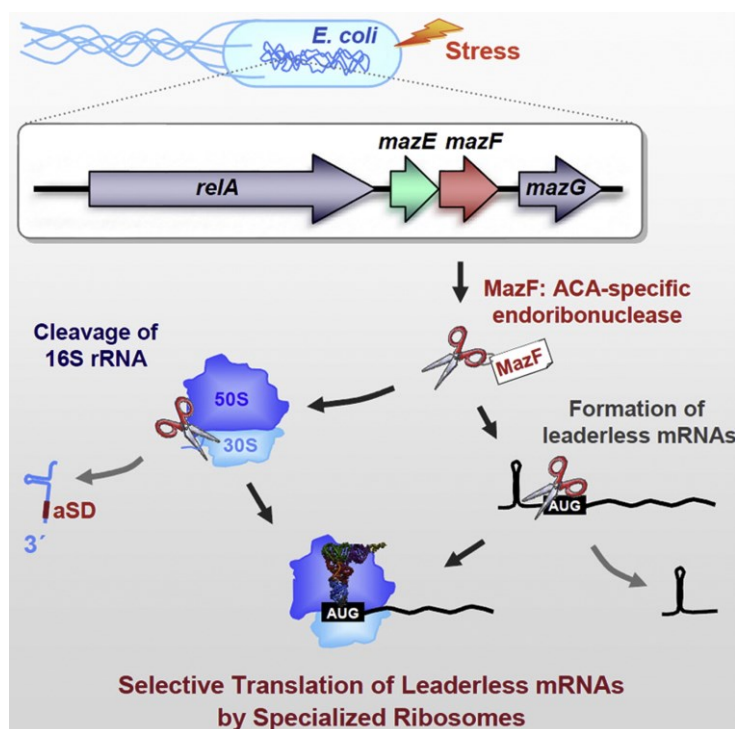
operonu je v tomto případě regulována mechanismem, který se nazývá podmíněná kooperativita (Overgaard *et al.*, 2008).

Výsledky studie Nely Nikolic z roku 2018 experimentálně podpořily hypotézu formulovanou v roce 2003, podle níž exprese MazF může být post-transkripčně autoregulována. Jak bylo dříve prokázáno, MazF je endoribonukleáza štěpící mRNA v místech, která obsahují sekvenci ACA. Několik takovýchto sekvencí je obsaženo i v transkriptu genu pro toxin MazEF TA systému. Experimenty Nikolic ukázaly, že MazF štěpí a degraduje i vlastní mRNA a tím reguluje hladinu exprese *mazEF* operonu (Nikolic *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2003).

Výsledkem působení aktivovaného MazF je podle studie Susanne Christensen inhibice translace a ztráta schopnosti bakterií vytvářet kolonie (Susanne K. Christensen *et al.*, 2003). Později bylo zjištěno, že nedochází k zastavení syntézy veškerých proteinů v buňce. Asi 10 % proteinů je nadále tvořeno. Jedná se o proteiny stresových adaptací, díky jejichž produkci je buněčná subpopulace schopna přežít stresové podmínky, které u ostatních buněk vedou k buněčné smrti (Amitai *et al.*, 2009).

Jakmile je následkem stresu MazF toxin aktivován, štěpí stávající mRNA v buňce na místech obsahujících ACA sekvenci. U proteinů stresových adaptačních mechanismů se tato sekvence nachází v 5'UTR mRNA za Shine-Dalgarno (SD) sekvencí. Takto dochází k vytvoření ImRNA. MazF kromě mRNA také cílí na 30S podjednotku ribozomů, kde štěpí 16S rRNA v místě ACA kodónu. Důsledkem je vznik tzv. „stresových ribozomů“, které postrádají na 3' konci 16S rRNA 43 nukleotidů včetně anti-Shine-Dalgarno sekvence (aSD). Kvůli chybějící aSD sekvenci nemohou tyto ribozomy translatovat standardní mRNA. Jejich existence je však stěžejní pro translaci ImRNA (Vesper *et al.*, 2011).

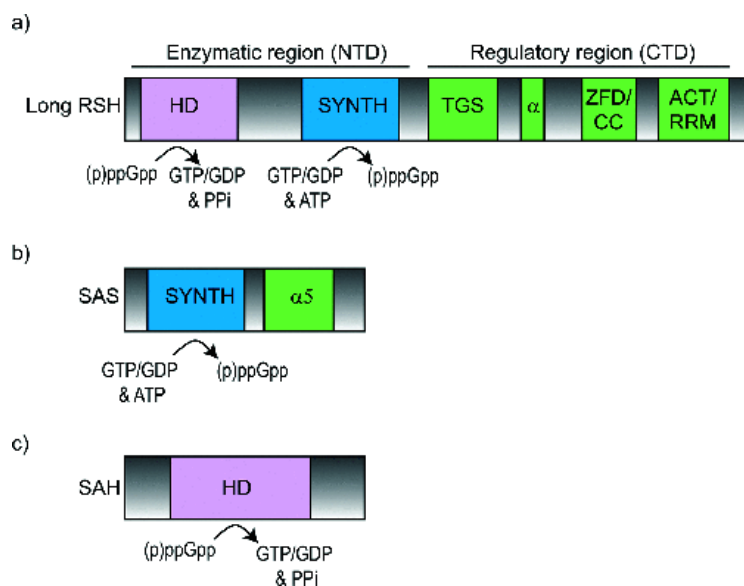
Následuje Obrázek 9 shrnující způsob, kterým se MazEF TA systém podílí na vzniku perzisterů.



Obrázek 9 – Schematické znázornění uplatnění MazEF TA systému při vzniku perzistentního stavu. Během stresových podmínek dojde k aktivaci toxinu MazF. MazF je endoribonukleáza, která štěpí mRNA v sekvenci ACA. Většina mRNA nacházející se v buňce je tak degradována. Působením MazF vznikají také lmRNA a stresové-ribozomy, díky nimž může probíhat syntéza proteinů důležitých pro dané podmínky. Převzato z Vesper *et al.*, 2011.

### 5.2.2 Stringentní odpověď

Stringentní odpověď je jedním z regulačních mechanismů bakteriálních buněk. K jejímu spuštění dochází v reakci na stres způsobený nedostatkem aminokyselin, mastných kyselin, železa nebo fosfátu (William A. Haseltine *et al.*, 1972; Seyfzadeh *et al.*, 1993; Vinella *et al.*, 2005). Klíčovou roli během stringentní odpovědi hrají signální molekuly guanosintetrafosfát a guanosinpentaforfát, souborně označované zkratkou (p)ppGpp. Regulaci jejich hladiny v jednotlivých buňkách zajišťují RSH proteiny. Jedná se o enzymy, které (p)ppGpp syntetizují a/nebo hydrolyzují. RSH proteiny lze rozdělit na dlouhé RSH enzymy, které se skládají ze 6 domén, a jednodoménové malé syntetázy alarmonů (SAS) a malé hydrolázy alarmonů (SAH). N-terminální doména dlouhých RSH proteinů je tvořena syntetázovou doménou, která zprostředkovává syntézu (p)ppGpp za pomoci ATP a GDP nebo GTP, a hydrolázovou doménou, jež zajišťuje degradaci (p)ppGpp za vzniku GDP nebo GTP a pyrofosfátu. C-terminální doména dlouhých RSH zastává regulační funkci. U bakterie *E. coli* je syntéza a degradace (p)ppGpp zajišťována dlouhými RSH enzymy RelA a SpoT (Atkinson *et al.*, 2011; Cashel, 1969).



Obrázek 10 – Schéma uspořádání domén proteinů patřících mezi RSH. a) Dlouhé RSH enzymy jsou tvořeny hydrolázovou (HD) a syntetázovou (SYNTH) doménou na N-konci proteinu, domény C-konce proteinu plní regulační roli. b) SAS se skládají ze syntetázové domény (SYNTH) a alfa helikální ( $\alpha$ ) domény důležité během vytváření tetramerů SAS. c) SAH jsou enzymy obsahující pouze hydrolázovou doménu. Převzato z Irving & Corrigan, 2018.

Pro syntézu (p)ppGpp pomocí RelA je zapotřebí, aby RelA byla aktivována. K její aktivaci dochází, když interaguje s nenabitou tRNA, která se nachází v A-místě ribozomu (W. A. Haseltine & Block, 1973). Podle výsledků studie z roku 2018 předchází aktivaci syntézy (p)ppGpp vznik komplexu tvořeného nenabitou tRNA a TGS doménou RelA a následné navázání tohoto komplexu na ribozom. Komplex tRNA a RelA interaguje s 23S rRNA a 16S rRNA. Právě interakce se sarcin-ricinovou smyčkou (SRL), nacházející se na 23S rRNA, a proteinem L11, který je také součástí 50S podjednotky ribozomu, jsou nutné pro aktivaci RelA a spuštění syntézy (p)ppGpp (Parker *et al.*, 1976; Winther *et al.*, 2018). Za exponenciálního růstu jsou aminokyseliny v komplexu s tRNA dodávány do A-místa ribozomu a postupně dochází k jejich začleňování do nově vznikajícího polypeptidu (W. A. Haseltine & Block, 1973). Během hladovění na aminokyseliny stoupá koncentrace nenabítených tRNA a mění se jejich poměr vůči tRNA, které na sobě aminokyselinu navázanou mají. Pokud koncentrace nenabítených tRNA stoupne na pětinašobek až desetinásobek koncentrace nabitých tRNA, dojde ke spuštění syntézy (p)ppGpp, kterému předchází zastavení translace, neboť nenabité tRNA přítomné v A-místě ribozomu mají na translaci inhibiční účinek (Rojiani *et al.*, 1989).

Aktivita RelA je autoregulována. Podle výsledků studie z roku 2019 za autoregulaci stojí intramolekulární interakce jednotlivých domén enzymu. C-terminální doména inhibuje jeho aktivitu. Velký podíl na inhibici syntézy (p)ppGpp má ACT doména, po jejíž delecii došlo k nekontrolovanému zvýšení hladiny (p)ppGpp v buňce a zastavení translace (Turnbull *et al.*,

2019). Naopak pozitivní vliv na aktivitu RelA má přítomnost jejího produktu, tedy ppGpp (Shyp *et al.*, 2012). Jak již bylo zmíněno výše, RelA dokáže syntetizovat jak pppGpp, tak ppGpp v závislosti na tom, zda má k dispozici GTP nebo GDP. V případě, že vytvoří pentafofát pppGpp, může být tento nukleotid následně přeměněn na tetrafosfát ppGpp pomocí pppGpp fosfohydrolázy (gpp) (Somerville & Ahmed, 1979). Na možný důvod pro přeměnu pppGpp na ppGpp poukazují výsledky studie Undine Mechold, z nichž vyplývá, že ppGpp je účinnějším regulátorem než pppGpp (Mechold *et al.*, 2013).

Dalším RSH enzymem, který se podílí na regulaci buněčné hladiny (p)ppGpp je SpoT. Na rozdíl od RelA se jedná o enzym, jež kromě syntézy (p)ppGpp zajišťuje degradaci těchto nukleotidů, neboť má funkční jak syntetázovou, tak hydrolázovou doménu (An *et al.*, 1979). Od RelA se také odlišuje tím, že SpoT nezačne syntetizovat (p)ppGpp v reakci na nedostatek aminokyselin, ale syntézou reaguje na stres způsobený nouzí o zdroje železa, mastných kyselin nebo uhlíku (Seyfzadeh *et al.*, 1993; Vinella *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 1991). Během stresu, jehož příčinou je nedostatek mastných kyselin nebo uhlíku, je pro syntézu (p)ppGpp důležitý protein přenášející acyly (ACP). Tento protein je kofaktorem biosyntézy mastných kyselin a reguluje aktivitu SpoT. ACP interaguje s TGS doménou na C-konci SpoT. Pokud buňka netrpí nedostatkem mastných kyselin, forma ACP, jež je navázána na TGS doménu SpoT zajišťuje, že SpoT bude upřednostňovat hydrolýzu (p)ppGpp před jeho syntézou. Jestliže dojde k inhibici syntézy mastných kyselin, změní se poměr jednotlivých forem ACP navázaných na SpoT. Změna formy ACP vede k přechodu od hydrolýzy (p)ppGpp k jeho syntéze (Battesti & Bouveret, 2006).

Spuštění stringentní odpovědi u *Escherichia coli* ovlivní buněčný metabolismus tak, že dochází ke stimulaci nebo naopak inhibici exprese asi 500 genů. Působení (p)ppGpp v buňce je pleiotropní a ovlivňuje fyziologický stav buňky několika mechanismy. Delece (p)ppGpp syntetáz má za následek výrazné snížení perzistentních buněk v populaci *Escherichia coli* (Korch *et al.*, 2003). (p)ppGpp inhibuje replikaci a syntézu nukleotidů (Rymer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018). (p)ppGpp se také váže na RNA polymerázu (RNAP) a tím snižuje transkripci genů pro rRNA a tRNA. Transkripce genů pro biosyntézu aminokyselin je během stringentní odpovědi stimulována (Durfee *et al.*, 2008; Traxler *et al.*, 2008). Kromě (p)ppGpp je pro inhibici transkripce genů pro rRNA a tRNA a stimulaci promotorů syntézy aminokyselin důležitý také transkripční faktor DksA. DksA je proteinem o délce 151 aminokyselin, který se stejně jako (p)ppGpp váže přímo na RNAP a způsobí zkrácení životnosti otevřeného komplexu. Tím inhibuje transkripci genů, na jejichž promotorech dochází k tvorbě otevřeného komplexu

s krátkou životností a naopak zesiluje transkripci z promotorů, které tvoří otevřené komplexy s dlouhým poločasem rozpadu, mezi něž patří promotory genů pro biosyntézu aminokyselin (Molodtsov *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2004, 2005). Sringentní odpověď ovlivňuje i translaci. Kromě zmíněné RNAP cílí (p)ppGpp na proteiny nepostradatelné během translace, kterými jsou například IF-2, EF-G nebo EF-Tu. Interakce (p)ppGpp s těmito iniciačními a elongačními faktory vede k inhibici translace (Mitkevich *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 1984).

## 6. Závěr

Perzistentní buňky jsou nedílnou součástí bakteriální populace a podílejí se na zajištění jejího přežití na daném místě v případě, že dojde ke zhoršení okolních podmínek. Z literatury vyplývá, že ke vzniku perzistentních buněk může dojít buď stochasticky, aniž by bakteriální populace čelila nepříznivým podmínkám, nebo je jejich tvorba indukována existencí konkrétního stresu (Balaban *et al.*, 2004; Kussell *et al.*, 2005; Kotte *et al.*, 2014).

Mechanismy vzniku perzistentního stavu jsou různorodé. Rozdíly je možné nalézt v závislosti na tom, zda se jedná o grampozitivní nebo gramnegativní bakterii. Zároveň platí, že perzistentní stav může být nastolen pomocí několika odlišných mechanismů i u bakterie jednoho druhu.

Tato práce se snaží shrnout současné poznatky o hlavních mechanismech vedoucích k perzistenci, které byly doposud prozkoumány. Ukazuje, že stringentní odpověď a její efekторы interagující s TA systémy typu II ovlivňují vznik perzistentního stavu u gramnegativních bakterií, zatímco Krebsův cyklus a pokles PMF vedoucí ke snížení množství ATP v buňce mají vliv na perzistenci jak u gramnegativních bakterií, jakou je například *Escherichia coli*, tak u grampozitivních bakterií, mezi něž se řadí i *Staphylococcus aureus*. Dále se uvádí, že kromě různých mechanismů, jakými dochází k nastolení perzistentního stavu, se od sebe mohou jednotliví perzisteři lišit v závislosti na tom, zda u nich došlo k vyvinutí multitolerance nebo zda jsou schopni tolerovat působení antibiotika s právě jedním mechanismem účinku.

Dosavadní zkoumání mechanismů nastolení perzistentního stavu probíhalo především na bakteriích *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Oblastí pro další výzkum je verifikace poznatých mechanismů vzniku perzistence u všech klinicky významných bakterií.

## 7. Seznam literatury

- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D., & Laub, M. T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the  $\beta$  sliding clamp. *Molecular Cell*, 52(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.014>
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., & Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 6059–6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6059>
- Amato, S. M., & Brynildsen, M. P. (2015). Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. *Current Biology : CB*, 25(16), 2090–2098. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.034>
- Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., & Engelberg-Kulka, H. (2009). *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both “Death Proteins” and “Survival Proteins.” *PLoS Genetics*, 5(3), e1000390. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000390>
- An, G., Justesen, J., Watson, R. J., & Friesen, J. D. (1979). Cloning the *spoT* gene of *Escherichia coli*: identification of the *spoT* gene product. *Journal of Bacteriology*, 137(3).
- Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of ppGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life. *PLoS ONE*, 6(8), e23479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690), 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1048–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
- Berghoff, B. A., Hoekzema, M., Aulbach, L., & Wagner, E. G. (2017). Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Molecular microbiology*, 103(6), 1020–1033. <https://doi.org/10.1111/mmi.13607>
- Bigger, J. W. (1944). Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent



Sterilisation. *Lancet*, 497–500.

- Black, D. S., Irwin, B., & Moyed, H. S. (1994). Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 4081–4091. <https://doi.org/10.1128/jb.176.13.4081-4091.1994>
- Black, D. S., Kelly, A. J., Mardis, M. J., & Moyed, H. S. (1991). Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5732–5739. <https://doi.org/10.1128/jb.173.18.5732-5739.1991>
- Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. C. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(2), 185–191. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1981>
- Blower, T. R., Short, F. L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X. Y., Fineran, P. C., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 6158–6173. <https://doi.org/10.1093/nar/gks231>
- Boggild, A., Sofos, N., Andersen, K. R., Feddersen, A., Easter, A. D., Passmore, L. A., & Brodersen, D. E. (2012). The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure*, 20(10), 1641–1648. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.017>
- Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2018). Quorum Sensing-Regulated Phenol-Soluble Modulins Limit Persister Cell Populations in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00255>
- Brantl, S. (2012). Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biology*, 9(12), 1488–1490. <https://doi.org/10.4161/rna.23045>
- Brent, R., & Ptashne, M. (1981). Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), 4204–4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4204>
- \*Brzozowska, I., & Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid*, 70(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.01.007>
- \*Bukowski, M., Rojowska, A., & Wladyka, B. (2011). Prokaryotic toxin-antitoxin systems - the role in bacterial physiology and application in molecular biology. *Acta Biochimica*

- Polonica*, 58(1), 1–9. [https://doi.org/10.18388/abp.2011\\_2278](https://doi.org/10.18388/abp.2011_2278)
- Cashel, M. (1969). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3133–3141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93106-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93106-6)
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., & Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6424–6434. <https://doi.org/10.1093/nar/gks297>
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., & Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature microbiology*, 1, 16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>
- Correia, F. F., D’Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B. L., Makarova, K., Koonin, E. V., & Lewis, K. (2006). Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8360–8367. <https://doi.org/10.1128/JB.01237-06>
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., & Wagner, E. G. (2007). An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular cell*, 26(3), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.003>
- Dörr, T., Lewis, K., & Vulić, M. (2009). SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Dörr, T., Vulić, M., & Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, 8(2), e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Ding, J. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>
- Ebner, P., Luqman, A., Reichert, S., Hauf, K., Popella, P., Forchhammer, K., Otto, M., & Götz, F. (2017). Non-classical Protein Excretion Is Boosted by PSM $\alpha$ -Induced Cell Leakage. *Cell reports*, 20(6), 1278–1286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.045>

- Engelberg-Kulka, H., Hazan, R., & Amitai, S. (2005). mazEF: A chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. In *Journal of Cell Science* (Vol. 118, Issue 19, pp. 4327–4332). The Company of Biologists Ltd.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.02619>
- Feng, B., Mandava, C. S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., Li, N., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Wu, J., Sanyal, S., Lei, J., & Gao, N. (2014). Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS biology*, 12(5), e1001866.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001866>
- Feng, J., Auwaerter, P. G., & Zhang, Y. (2015). Drug combinations against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PloS one*, 10(3), e0117207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117207>
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., & Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3116–3120.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3116>
- \*Gerdes, Kenn, Christensen, S. K., & Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1147>
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., & Gerdes, K. (2013). Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Molecular Cell*, 52(2), 248–254.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.045>
- Gkekas, S., Singh, R. K., Shkumatov, A. V, Messens, J., Fauvart, M., Verstraeten, N., Michiels, J., & Versées, W. (2017). Structural and biochemical analysis of *Escherichia coli* ObgE, a central regulator of bacterial persistence. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 5871–5883. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.761809>
- Gotfredsen, M., & Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Molecular Microbiology*, 29(4), 1065–1076.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00993.x>
- Hansen, S., Vulić, M., Min, J., Yen, T.-J., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., & Lewis, K. (2012). Regulation of the *Escherichia coli* HipBA Toxin-Antitoxin System by Proteolysis. *PLoS ONE*, 7(6), e39185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039185>
- Haseltine, W. A., & Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra and pentaphosphate

- requires the presence of a codon specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(5), 1564–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1564>
- Haseltine, William A., Block, R., Gilbert, W., & Weber, K. (1972). MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature*, 238(5364), 381–384. <https://doi.org/10.1038/238381a0>
- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A., & Holden, D. W. (2014). Internalization of salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*, 343(6167), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Hofsteenge, N., van Nimwegen, E., & Silander, O. K. (2013). Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC microbiology*, 13, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-25>
- Hurley, J. M., Cruz, J. W., Ouyang, M., & Woychik, N. A. (2011). Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14770–14778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108969>
- Hurwitz, C., Braun, C. B., & Rosano, C. L. (1981). Role of ribosome recycling in uptake of dihydrostreptomycin by sensitive and resistant *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 652(1), 168–176. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(81\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0005-2787(81)90220-3)
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., & Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14328–14333. <https://doi.org/10.1073/pnas.251327898>
- Christensen, Susanne K., & Gerdes, K. (2003). RelE toxins from *Bacteria* and *Archaea* cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Molecular Microbiology*, 48(5), 1389–1400. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03512.x>
- Christensen, Susanne K., Pedersen, K., Hansen, F. G., & Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *Journal of Molecular Biology*, 332(4), 809–819. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00922-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00922-7)
- \*Irving, S. E., & Corrigan, R. M. (2018). Triggering the stringent response: Signals responsible

- for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. In *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 164, Issue 3, pp. 268–276). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000621>
- Kedzierska, B., Lian, L. Y., & Hayes, F. (2007). Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic acids research*, 35(1), 325–339. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1028>
- Keiler, K. C., Waller, P. R. H., & Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, 271(5251), 990–993. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.990>
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., & Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., & Lewis, K. (2011). Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00100-11>
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8172–8180. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>
- Korch, S. B., Henderson, T. A., & Hill, T. M. (2003). Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1199–1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>
- Korch, S. B., & Hill, T. M. (2006). Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: Effects on macromolecular synthesis and persister formation. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3826–3836. <https://doi.org/10.1128/JB.01740-05>
- Kotte, O., Volkmer, B., Radzikowski, J. L., & Heinemann, M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Molecular Systems Biology*, 10(7), 736. <https://doi.org/10.15252/msb.20135022>
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., & Leibler, S. (2005). Bacterial persistence: A model of survival in changing environments. *Genetics*, 169(4), 1807–1814. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035352>
- Kussell, E., & Leibler, S. (2005). Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science*, 309(5743), 2075–2078.

- <https://doi.org/10.1126/science.1114383>
- Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1468–1473. <https://doi.org/10.1128/AAC.02135-12>
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drze, P., & Van Melderren, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5513–5525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr131>
- Leung, V., & Lévesque, C. M. (2012). A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of bacteriology*, 194(9), 2265–2274. <https://doi.org/10.1128/JB.06707-11>
- Li, G. Y., Zhang, Y., Inouye, M., & Ikura, M. (2008). Structural mechanism of transcriptional autorepression of the *Escherichia coli* RelB/RelE antitoxin/toxin module. *Journal of molecular biology*, 380(1), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.039>
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995). Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9), 1948–1953. <https://doi.org/10.1128/aac.39.9.1948>
- \*Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., & García-Del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS microbiology reviews*, 40(5), 592–609. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw022>
- Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., & Glaser, G. (2001). The Regulation of the *Escherichia coli* mazEF Promoter Involves an Unusual Alternating Palindrome. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5975–5984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008832200>
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K. P., & Inouye, M. (2012b). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 84(5), 979–989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08068.x>
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Yamaguchi, Y., & Inouye, M. (2012a). A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 328(2), 174–181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02496.x>
- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K. S., & Cashel, M. (2013). Differential

- regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 41(12), 6175–6189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt302>
- Mitkevich, V. A., Ermakov, A., Kulikova, A. A., Tankov, S., Shyp, V., Soosaar, A., Tenson, T., Makarov, A. A., Ehrenberg, M., & Hauryliuk, V. (2010). Thermodynamic Characterization of ppGpp Binding to EF-G or IF2 and of Initiator tRNA Binding to Free IF2 in the Presence of GDP, GTP, or ppGpp. *Journal of Molecular Biology*, 402(5), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.016>
- Möker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of bacteriology*, 192(7), 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>
- Molodtsov, V., Sineva, E., Zhang, L., Huang, X., Cashel, M., Ades, S. E., & Murakami, K. S. (2018). Allosteric Effector ppGpp Potentiates the Inhibition of Transcript Initiation by DksA. *Molecular Cell*, 69(5), 828-839.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.035>
- Moyed, H. S., & Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
- Moyed, H. S., & Broderick, S. H. (1986). Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 166(2), 399–403. <https://doi.org/10.1128/jb.166.2.399-403.1986>
- Mwangi, M. M., Wu, S. W., Zhou, Y., Sieradzki, K., de Lencastre, H., Richardson, P., Bruce, D., Rubin, E., Myers, E., Siggia, E. D., & Tomasz, A. (2007). Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9451–9456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609839104>
- Nikolic, N., Bergmiller, T., Vandervelde, A., Albanese, T. G., Gelens, L., & Moll, I. (2018). Autoregulation of *mazEF* expression underlies growth heterogeneity in bacterial populations. *Nucleic Acids Research*, 46(6), 2918–2931. <https://doi.org/10.1093/nar/gky079>
- Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3230–3239.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00243-13>

- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G., & Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Molecular Microbiology*, 69(4), 841–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06313.x>
- Pandey, D. P., & Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33(3), 966–976. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>
- Parker, J., Watson, R. J., Friesen, J. D., & Fiil, N. P. (1976). A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11. *MGG Molecular & General Genetics*, 144(1), 111–114. <https://doi.org/10.1007/BF00277313>
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: A critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>
- Paul, B. J., Berkmen, M. B., & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7823–7828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501170102>
- \*Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological reviews*, 60(4), 575–608.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K., & Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. In *Cell* (Vol. 112, Issue 1, pp. 131–140). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01248-5)
- Persky, N. S., Ferullo, D. J., Cooper, D. L., Moore, H. R., & Lovett, S. T. (2009). The ObgE/CgtA GTPase influences the stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 73(2), 253–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06767.x>
- Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M. A. B., Ge, H., Sun, Y., Xie, X. S., & Bai, F. (2016). Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Molecular Cell*, 62(2), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.035>



- Rymer, R. U., Solorio, F. A., Tehranchi, A. K., Chu, C., Corn, J. E., Keck, J. L., Wang, J. D., & Berger, J. M. (2012). Binding mechanism of metal-NTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases. *Structure (London, England : 1993)*, 20(9), 1478–1489. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.017>
- Rojas, A. M., Ehrenberg, M., Andersson, S. G. E., & Kurland, C. G. (1984). ppGpp inhibition of elongation factors Tu, G and Ts during polypeptide synthesis. *MGG Molecular & General Genetics*, 197(1), 36–45. <https://doi.org/10.1007/BF00327920>
- Rojiani, M. V., Jakubowski, H., & Goldman, E. (1989). Effect of variation of charged and uncharged tRNA(Trp) levels on ppGpp synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6493–6502. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6493-6502.1989>
- Seeger, J. & Brockmann, H. J. (1987). What is bet-hedging (Oxford surveys in evolutionary biology).pdf. In *Oxford surveys in Evolutionary Biology* (Vol. 4, pp. 182–211).
- Seyfzadeh, M., Keener, J., & Nomura, M. (1993). SpoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 11004–11008. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11004>
- Shan, Y., Gandt, A. B., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., & Lewis, K. (2017). ATP-Dependent persister formation in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>
- Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B. P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J., & Haurlyuk, V. (2012). Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Reports*, 13(9), 835–839. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.106>
- Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., & Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*, 323(5912), 396–401. <https://doi.org/10.1126/science.1163806>
- Somerville, C. R., & Ahmed, A. (1979). Mutants of *Escherichia coli* defective in the degradation of guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate (pppGpp). *MGG Molecular & General Genetics*, 169(3), 315–323. <https://doi.org/10.1007/BF00382277>
- Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>

- Tan, Q., Awano, N., & Inouye, M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Molecular microbiology*, 79(1), 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07433.x>
- Tashiro, Y., Kawata, K., Taniuchi, A., Kakinuma, K., May, T., & Okabe, S. (2012). RelE-mediated dormancy is enhanced at high cell density in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1169–1176. <https://doi.org/10.1128/JB.06628-11>
- \*Trastoy, R., Manso, T., Fernández-García, L., Blasco, L., Ambroa, A., Pérez Del Molino, M. L., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2018). Mechanisms of Bacterial Tolerance and Persistence in the Gastrointestinal and Respiratory Environments. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00023-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-18>
- Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., & Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 68(5), 1128–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x>
- Tu, G. F., Reid, G. E., Zhang, J. G., Moritz, R. L., & Simpson, R. J. (1995). C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9322–9326. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9322>
- Turnbull, K. J., Dzhygyr, I., Lindemose, S., Hauryliuk, V., & Roghanian, M. (2019). Intramolecular Interactions Dominate the Autoregulation of *Escherichia coli* Stringent Factor RelA. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), 1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01966>
- Tuchscher, L., Geraci, J., & Löffler, B. (2017). *Staphylococcus aureus* Regulator Sigma B is Important to Develop Chronic Infections in Hematogenous Murine Osteomyelitis Model. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 6(3), 31. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030031>
- Unoson, C., & Wagner, E. G. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 70(1), 258–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06416.x>
- \*Van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. - *PubMed - NCBI*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333307>

- Verstraeten, N., Gkekas, S., Kint, C. I., Deckers, B., Van den Bergh, B., Herpels, P., Louwagie, E., Knapen, W., Wilmaerts, D., Dewachter, L., Fauvart, M., Singh, R. K., Michiels, J., & Versées, W. (2019). Biochemical determinants of ObgE-mediated persistence. *Molecular microbiology*, 112(5), 1593–1608.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.14382>
- Verstraeten, N., Knapen, W. J., Kint, C. I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J. E., Fu, Q., David, C. C., Fierro, A. C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M., & Michiels, J. (2015). Obg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance. *Molecular Cell*, 59(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., & Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell*, 147(1), 147–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.047>
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & D’Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 56(4), 958–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04601.x>
- Vogwill, T., Comfort, A. C., Furió, V., & MacLean, R. C. (2016). Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics. *Journal of evolutionary biology*, 29(6), 1223–1233. <https://doi.org/10.1111/jeb.12864>
- Wang, X., Lord, D. M., Cheng, H. Y., Osbourne, D. O., Hong, S. H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., & Wood, T. K. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 855–861.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1062>
- Wang, Y., Bojer, M. S., George, S. E., Wang, Z., Jensen, P. R., Wolz, C., & Ingmer, H. (2018). Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase. *Scientific reports*, 8(1), 10849.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29123-0>
- Wilmaerts, D., Bayoumi, M., Dewachter, L., Knapen, W., Mika, J. T., Hofkens, J., Dedecker, P.,

- Maglia, G., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2018). The Persistence-Inducing Toxin HokB Forms Dynamic Pores That Cause ATP Leakage. *mBio*, 9(4), e00744-18.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00744-18>
- Winther, K. S., Roghanian, M., & Gerdes, K. (2018). Activation of the Stringent Response by Loading of RelA-tRNA Complexes at the Ribosomal A-Site. *Molecular Cell*, 70(1), 95-105.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.033>
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1003.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5980–5990.  
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)67694-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)67694-5)
- \*Yamaguchi, Y., & Inouye, M. (2009). mRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin-Antitoxin Systems. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 85, Issue C, pp. 467–500). Academic Press.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00812-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00812-X)
- \*Yamaguchi, Y., Park, J.-H., & Inouye, M. (2011). Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132412>
- Zalis, E. A., Nuxoll, A. S., Manuse, S., Clair, G., Radlinski, L. C., Conlon, B. P., Adkins, J., & Lewis, K. (2019). Stochastic variation in expression of the tricarboxylic acid cycle produces persister cells. *MBio*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01930-19>
- Zhang, L., Chiang, W. C., Gao, Q., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., & Zhang, G. (2012). The catabolite repression control protein Crc plays a role in the development of antimicrobial-tolerant subpopulations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 12), 3014–3019.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.061192-0>
- Zhang, Y., Zborníková, E., Rejman, D., & Gerdes, K. (2018). Novel (p)ppGpp Binding and

Metabolizing Proteins of *Escherichia coli*. mBio, 9(2), e02188-17.

<https://doi.org/10.1128/mBio.02188-17>

Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G., & Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*.

*Molecular Cell*, 12(4), 913–923. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00402-7)

\* značí sekundární citace